

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 37 38 874 A1

⑯ Int. Cl. 4:
A01H 1/06
C 12 N 5/00
C 12 N 13/00
C 12 N 15/00

⑯ Aktenzeichen: P 37 38 874.6
⑯ Anmeldetag: 16. 11. 87
⑯ Offenlegungstag: 17. 11. 88

⑯ Innere Priorität: ⑯ ⑯ ⑯

29.01.87 DE 37 02 659.3

⑯ Anmelder:

Institut botaniki imeni N.G. Cholodnogo Akademii
Nauk Ukrainskoj SSR, Kiew/Kiev, SU

⑯ Vertreter:

von Füner, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Ebbinghaus,
D., Dipl.-Ing.; Finck, K., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑯ Erfinder:

Mei'nikov, Pavel Viktorovič; Pasternak, Taras
Petrovič; Gleba, Jurij Jur'evič; Sytnik, Konstantin
Merkur'evič, Kiew/Kiev, SU

⑯ Verfahren zur Herstellung von genetisch transformierten Pflanzenobjekten

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der
Gentechnik der Pflanzen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung
von genetisch transformierten Pflanzenobjekten durch Ein-
führung eines transformierenden Faktors in das Rezipien-
tenobjekt und nachfolgende Selektion von Zelllinien und
Pflanzen aus diesem Rezipientenobjekt, die neue erbliche
Eigenschaften besitzen, wobei man als transformierenden
Faktor ein DNS-Molekül oder ein autonom replizierendes
Zellorganell und als Rezipientenobjekt eine Einzelzelle oder
eine Zelle im Zellverband verwendet und den transformie-
renden Faktor in das Rezipientenobjekt durch Mikroinjizie-
rung einführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auf gentech-
nischem Wege die Herstellung neuer, landwirtschaftlich
nutzbarer Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften.

DE 37 38 874 A1

BEST AVAILABLE COPY

DE 37 38 874 A1

Patentsprache

1. Verfahren zur Herstellung von genetisch transformierten Pflanzenobjekten durch Einführung eines transformierenden Faktors in das Rezipientenobjekt und nachfolgende Selektion von Zelllinien und Pflanzen aus diesem Rezipientenobjekt, die neue erbliche Eigenschaften besitzen, dadurch gekennzeichnet, daß man als transformierenden Faktor ein DNS-Molekül oder ein autonom replizierendes Organell und als Rezipientenobjekt eine Einzelzelle oder eine Zelle im Zellverband verwendet und den transformierenden Faktor in das Rezipientenobjekt durch Mikroinjizierung einführt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Rezipientenobjekt eine Zelle im Zellverband verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Rezipientenobjekt eine Einzelzelle oder eine Zelle im Zellverband verwendet, die zur Embryogenese oder zur Regenerierung einer ganzen Pflanze fähig ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroinjizierung unter Einwirkung von Druck oder eines elektrischen Feldes ausgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroinjizierung unter Einwirkung eines elektrischen Feldes ausgeführt wird.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der gentechnischen Behandlung von Pflanzen, insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von genetisch transformierten pflanzlichen Objekten, das zur Herstellung neuer Arten (Formen) von Pflanzen, darunter auch von für die Landwirtschaft wichtigen Pflanzen Verwendung findet, die durch bestimmte Eigenschaften gekennzeichnet sind, wie spezifische Beständigkeit gegen pathogene Viren und Mikroorganismen, veränderte Aminosäurezusammensetzung, erhöhter Anteil an verwertbarer Biomasse, sowie erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen ungünstige Umweltfaktoren u.a.

Es sind verschiedene Verfahren bekannt, die es gestatten, Protoplaste von höheren Pflanzen so zu transformieren, daß nachfolgend Zelllinien und Pflanzen mit neuen vererbaren Eigenschaften hergestellt werden können. So ist beispielsweise ein Verfahren bekannt, das darin besteht, daß man einer Suspension der Protoplasten von *Nicotiana tabacum* DNS zugibt, und das erhaltene Gemisch danach durch physikalische und chemische Faktoren beeinflußt, was zum Eindringen von DNS in die Protoplasten führt (J. Potrykus, R.D. Shillito, M.W. Saul, J. Paszkowsky, "Direct Gene Transfer. State of the Art and Future Potential", Plant Mol. Biol. Reporter, Bd. 3, Nr. 3, 1985, S. 117 – 128).

Es ist auch ein Verfahren bekannt, wonach man Protoplasten von *Nicotiana tabacum* genetisches Material, das in Lipidbläschen (Liposomen) eingeschlossen ist, in Gegenwart eines Agglutinierungsmittels zugibt. Das führt zur Vereinigung der Liposomen mit den Protoplasten unter Eindringen des genetischen Materials in den Protoplast (T. Nagata, "Liposomes as a Carrier of Ti-Plasmid into Protoplasts", "Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions"; Ed. Pühler, Springer-Verlag, Berlin e.a., 1983, 268 – 273).

Die bekannten Verfahren sind nur auf eine begrenzte

Anzahl von Pflanzenarten anwendbar, und zwar nur auf Pflanzen und Zellkulturen, für die Verfahren zur Herstellung und Züchtung von Protoplasten, aus denen nachfolgend die entsprechenden Pflanzen regeneriert werden können, entwickelt worden sind. Außerdem weisen die bekannten Verfahren nur eine niedrige Transformationseffektivität (höchstens 1%) und einen erheblichen Verbrauch an transformierendem Faktor auf.

10 Es ist ein Verfahren zur Herstellung genetisch transformierter pflanzlicher Objekte bekannt, bei dem als Rezipient Protoplaste von *Nicotiana tabacum* verwendet werden. In die Protoplaste wird durch Mikroinjektion das Plasmid pCGN 561 eingeführt (A. Crossway et al., "Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts", Mol. Gen. Genet., 1986, Bd. 202, S. 179, 185).

Bei dem erwähnten Verfahren ist die Verwendung von Protoplasten unumgänglich, weshalb es ebenfalls nur auf eine beschränkte Zahl wirtschaftlich wertvoller Pflanzen, wie z.B. auf Pflanzen der Familie Solanaceae (Tomate und Kartoffel) angewandt werden kann.

Für die meisten wirtschaftlich wichtigen Pflanzen, die in vitro gezüchtet werden (Suspensionskultur, Calluskultur, Kultur isolierter Organe, embryogene Calluskultur) wurden bislang jedoch noch keine Transformationsverfahren entwickelt.

Alle Autoren halten es für notwendig, die Protoplasten zu isolieren, wobei auch die Transformation nach der Isolierung der Protoplasten 0 bis 5 Tage betragen soll. In diesem Zusammenhang muß jedoch bemerkt werden, daß für die meisten landwirtschaftlich nutzbaren Pflanzen die Protoplasten nicht isoliert werden können, so daß die bekannten Verfahrensweisen nicht gentechnisch verbessert werden können (H. Lorz et al., "Studies in Cereal Transformation. Nuclear Techniques and in vitro Culture for Plant Improvement", Proc. Int. Symp., Vienna 19 – 23, 1985, 1986, 505 – 509; Ju. Ju. Gleba, K.M. Sytnik, "Kletocnaja inzenerija rastenij" (Zelltechnologie bei Pflanzen), Kiev, "Naukova Dumka", 1984, bzw. Übersetzung des Artikels, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1985; EP 01 75 966 A1).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung genetisch transformierter pflanzlicher Objekte (Zellen in Suspensionskultur, in Mikrokolonien sowie in verschiedenen pflanzlichen Strukturen) zu entwickeln, das eine Qualitätssteigerung bei Nutzpflanzen, insbesondere bei der Züchtung von Sorten landwirtschaftlicher Nutzpflanzen auf gentechnischem Wege ermöglicht, die folgende Vorteile aufweisen:

- spezifische Beständigkeit gegenüber bereits bekannten oder noch zu entwickelnden Herbiziden;
- spezifische Beständigkeit gegenüber pathogenen Viren und Mikroorganismen;
- veränderte Aminosäurezusammensetzung der wichtigsten Reserveeiweiße;
- Erhöhung des Anteils an verwertbarer Biomasse;
- erhöhte Beständigkeit gegenüber ungünstigen Umwelteinflüssen.

Die Aufgabe wird wie aus den vorstehenden Ansprüchen ersichtlich gelöst, indem man in eine Einzelzelle oder vorzugsweise eine Zelle in einem Zellverband ein DNS-Molekül oder ein autonom replizierendes Organell einführt. Das Rezipientenobjekt mit dem eingeführ-

ten transformierenden Faktor wird zur Herstellung von Zelllinien oder Pflanzen mit neuen erblichen Eigenschaften auf selektiven Nährmedien gezüchtet. Dabei erfolgt die Einführung des transformierenden Faktors in das Rezipientenobjekt durch Mikroinjektion, die nach beliebigen geeigneten Methoden durchgeführt werden kann. Es ist zweckmäßig, die Mikroinjektionen unter Einwirkung von Druck oder insbesondere eines elektrischen Feldes durchzuführen.

Die Verwendung einer Einzelzelle oder von Zellen im Zellverband als Rezipienten ermöglicht eine erhebliche Erweiterung der Zahl der genetisch manipulierbaren Pflanzenarten. Dies gilt in erster Linie für wirtschaftlich so wichtige Pflanzenfamilien wie Gräser (Getreide, z.B. Weizen, Hafer) und Hülsenfrüchtler.

Bisher hat man mit Protoplasten gearbeitet, da Zellen im genetischen und physiologischen Sinn nicht gleichartig sind. Jede Zelle hat ihr Programm und führt es aus. Die Zelle ist ein Protoplast, der schon eine bestimmte Entwicklung hinter sich hat, während der Protoplast eine Zelle ist, die keine individuellen Merkmale besitzt und in das gesamte genetische Programm bisher nicht realisiert wurde. Aus dem Protoplast kann man eine beliebige Zelle oder eine andere Zellart erhalten, je nach den Bedingungen wie Nährmedium, Zusatz von Hormonen etc. Aus der Zelle kann man nichts mehr mit einem bestimmten Programm erhalten. Es war deshalb überraschend, daß bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen wie Weizen, Hafer usw. von einer Einzelzelle oder von einer Zelle im Zellverband ausgegangen werden konnte.

Gegenwärtig sind verschiedene Verfahren zur Züchtung von Pflanzenarten in einer Suspensionskultur bekannt, die zur Synthese sekundärer Stoffwechselprodukte befähigt sind und von wichtiger praktische Bedeutung sind (*Rauwolfia serpentina*, *Dioscorea deltoidea*, *Papaver somniferum* u.a.). Bei der Suspensionskultur bzw. einem ähnlichen Verfahren der Tiefenkultur ist das Pflanzenmaterial Einzelzellen oder Zellen, die mehrzellige undifferenzierte Konglomerate unterschiedlicher Größe (Mikrokalli) bilden. Bei der Passage einer Suspensionskultur kommt es zu einer Anhäufung der Biomasse der Zellen und zu einer Produktion wertvoller sekundärer Stoffwechselprodukte dieser Zellen.

Für viele wirtschaftlich überaus wichtige Pflanzen wie z.B. solche aus der Familie der Kreuzblütler, wie z.B. Kraut bzw. Kohl (*Brassica oleracea*), Rettich (*Raphanus sativus*), aus der Familie der Hülsenfrüchtler, wie z.B. Soja (*Glycine max*), Erbsen (*Pisum sativum*), sowie aus der Familie der Gsamineen (Getreide), wie z.B. Weizen (*Triticum aestivum*), Hafer (*Avena sativa*) und Gerste (*Hordeum vulgare*), sind bereits Verfahren zur Herstellung von Kalli aus verschiedenen Explantaten bekannt. Bei Getreide hat sich die Verwendung unreifer und reifer Keimlinge als am erfolgreichsten erwiesen. Kalli ergeben nach einer Reihe von Passagen und nach einer Übertragung auf das entsprechende Nährmedium den Anstoß zur Entwicklung embryonaler Gewebsverbände. Das dabei entstehende Embroyd ist ein mehrzelliges, kompaktes, differenziertes Gebilde, bei dessen Züchtung man schließlich den ganzen pflanzlichen Organismus erhält.

Sämtliche oben erwähnten und viele andere wirtschaftlich wichtige Pflanzen können gegenwärtig nur durch Mikroinjektion genetisch transformiert werden, da sie nicht über die Protoplaststufe hergestellt werden können. Nur das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Transformation dieser und anderer Pflanzen.

die *in vitro* in Form von Einzelzellen und in organisierten und nichtorganisierten mehrzelligen Gebilden gezüchtet werden können.

Für die Gewinnung einer transformierten Zelllinie in einer Suspensionskultur wird mit dem unteren Ende einer Pipette mit zurückgezogener Spitze ein geringes Volumen einer Kultur, die mehrere hundert Zellen enthält, in eine auf dem Objektiv eines Mikroskops befestigte Mikrokammer eingebracht. Eine der Zellen wird mit Hilfe eines Mikrosaugnaps fixiert, dessen Durchmesser von der Größe der Zellen der jeweiligen Kultur abhängt (im allgemeinen 10 bis 50 µm). Die Zellwand wird durch rasches Einstechen einer Mikronadel durchbohrt. Nach der Injektion der DNS-Moleküle oder eines autonom replizierenden Organells, die entweder unter Druck zusammen mit der Flüssigkeit oder unter Einwirkung eines elektrischen Feldes durchgeführt wird, wird die Mikropipette aus der Zelle entfernt. Dann wird die nächste Zelle fixiert, in die ebenfalls genetisches Material fremden Ursprungs injiziert wird. Der transformierende Faktor wird in 10 bis 40 Zellen injiziert.

Die Füllung der Mikropipette mit der DNS-Lösung erfolgt entweder über das verjüngte untere Ende einer Pipette durch Erzeugung eines Unterdrucks oder über das obere Ende mit Hilfe einer Kapillare, die in die Mikronadel eingebracht wird.

In jede Zelle werden unter Druck 1 bis 10 pl DNS-Lösung eingespritzt, was ca. bis zu 10% des Zellvolumens ausmacht. Die Messung des in die jeweilige Zelle eingespritzten Lösungsvolumens erfolgt mit Hilfe eines Okulärmikrometers anhand der Wanderung des Meniskus an der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser bzw. Wasser und Öl in der Mikronadel. Dabei wird die DNS-Konzentration so gewählt, daß in die Zelle jeweils bis zu hundert Plasmidkopien gelangen.

Bei der Einspritzung der DNS mit Hilfe eines elektrischen Feldes bedient man sich einer Spannung am Ausgang der Stromquelle von bis zu 10 V. Die Kontaktierung mit der DNS-Lösung in der Mikronadel erfolgt mit Hilfe eines Platindrahts ("—"-Elektrode). Die zweite Elektrode ("+"-Elektrode) befindet sich in dem den Rezipienten umgebenden Nährmedium. Die elektrische Spannung wird in 3 bis 5 Impulsen mit einer Dauer von bis zu 0,5 s zugeführt.

Die Mikroinstrumente werden nach aus der Literatur bekannten Verfahren (von Brün, 1951) aus Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,5 bis 1 mm hergestellt. Die Arbeiten mit dem pflanzlichen Material werden mit sterilen Instrumenten in einer laminaren Strömung steriler Luft durchgeführt. Sämtliche Manipulationen erfolgen unter mikroskopischer Kontrolle.

Die mit dem verjüngten Ende der Pipette entnommenen injizierten Zellen werden dann auf einem selektiven Nährmedium gezüchtet, dessen Wahl vom Merkmal abhängt, das durch den transformierenden Faktor kodiert wird. So z.B. ist bei der Einspritzung von Plasmiden, die T-DNS-Sequenzen des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* enthalten und die Hormonsynthese in Tumorzellen kodieren, das selektive Medium ein hormonfreies Medium. Die auf einem solchen Medium ausgewählten Zellen sind gekennzeichnet durch Wachstumsfähigkeit auf hormonfreiem Medium. Dieses Merkmal ist von großer praktischer Bedeutung für die Züchtung von Zellen in einer Kultur, da Phytohormone die teuerste Komponente von Nährmedien darstellen.

Für die Gewinnung transformierter Pflanzen, die *in vitro* einen embryogenen Kallus bilden, überträgt man das Explantat, z.B. einen unreifen Keimling, auf ein die

Kallusbildung induzierendes Medium. Den gebildeten Kallus überträgt man dann auf ein das Wachstum der Zellmasse förderndes Medium. Mit zunehmender Zellzahl kommt es zur Differenzierung der Zellen, d.h. ein Teil derselben wächst stark in die Länge und hört dann auf, sich zu teilen, während ein anderer Teil proembryogene Strukturen (kompakte Zellgebierte) bildet. Die Größe dieser Strukturen hängt von der Pflanzenart ab. Bei Weizen beträgt sie z.B. 0,5 bis 2 mm auf den verschiedenen Differenzierungsstufen. Diese Strukturen scheidet man aus der Masse der nichtembryogenen Zellen visuell mit Hilfe von Präpariernadeln aus. Dann überträgt man sie in die Mikrokammer auf dem Objektisch des Mikroskops und bringt sie in ein flüssiges Nährmedium, wonach man sie z.B. mit Hilfe einer Unterdruck erzeugenden Kapillare oder zweier einen Winkel einschließenden Glasplatten mechanisch befestigt. In eine dieser Zellen der proembryogenen Struktur wird dann eine Mikronadel eingeführt und sodann nach einem der genannten Verfahren DNS injiziert. Dann wird in die nächste Zelle injiziert. Nach Behandlung sämtlicher im Gesichtsfeld zugänglicher Zellen wird der Kallus mit Hilfe einer Nadel gewendet, wonach noch in einige weitere Zellen injiziert wird.

Pro Kallus wird in 20 bis 30 Zellen DNS injiziert. Die Versuchsbedingungen, der Mikronadeldurchmesser und andere Parameter für die Injektion in die Zellen im Zellverband entsprechen denen, wie sie auch bei der Transformation von Einzelzellen angewandt werden.

Der auf diese Weise behandelte proembryogene Zellverband wird dann zwecks Embryogenese auf ein eine selektive Komponente enthaltendes Medium transferiert. Diese kann z.B. das Herbizid Roundup (N-(Phosphonomethyl)glycin) sein, wenn die Zellen mit einem Beständigkeit gegenüber diesem Stoff kodierenden Vektor transformiert sind. Es ist darauf hinzuweisen, daß die Züchtung eines gegenüber diesem Herbizid beständigen Weizens von großer praktischer Bedeutung ist.

Auf dem selektiven Medium entsteht dann aus dem proembryogenen Kallus ein Embryo. Aus diesem entwickelt sich dann die Pflanze, die auf dem Nährmedium in Anwesenheit eines selektiven Faktors wächst. Die vollausgebildete Pflanze wird dann im Boden eingepflanzt. Im weiteren kann sie sich dann auf in der Selektionspraxis üblichen Weise weiter vermehren.

In einer Reihe von Fällen, wie z.B. bei Soja (Glycine max) und Luzerne (Medicago sativa) ist bei der in vitro-Kultur eine Organogenese zu beobachten. In diesem Falle sind die Rezipienten die Zellen der in der Kultur de novo gebildeten Sproßspitze bzw. die Zellen des proregenerativen Gewebes. Die für die Züchtung der transformierten, aus der Organkultur regenerierten Pflanze erforderlichen Manipulationen mit Hilfe der Mikroinjektion entsprechen den Manipulationen, die auch bei der Gewinnung von Transformanten aus einer Kultur eines embryogenen Kallus durchgeführt werden.

Die Methode zur Züchtung von Pflanzen mit neuen Eigenschaften unter Verwendung von gezüchteten Kallus (embryogenen oder regenerierenden Pflanzen) bzw. unter Verwendung einer Organkultur besteht somit darin, daß man Vektormoleküle in die Zellen injiziert, deren Teilung und Differenzierung schließlich zur Bildung einer ganzen Pflanze führt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur genetischen Transformation kann unter Verwendung von genetischem Material durchgeführt werden, das unterschiedlich organisiert sein kann. So z.B. können Vektor-DNS-

Moleküle (Plasmide, Kosmide, Vektoren auf der Basis von Pflanzenviren), aus verschiedenen Spenderobjekten isolierte DNS-Totalpräparate sowie Zellorganellen (Chloroplasten und Mitochondrien), die DNS-Moleküle enthalten und zur autonomen Replikation fähig sind, verwendet werden.

Andererseits kann das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem man sich der Mikroinjektion bedient, zur Transformation anderer Rezipientenarten verwendet werden, die in vitro als Zellsuspension oder als Kallus gezüchtet werden, der zu verschiedenen Arten der Morphogenese befähigt ist.

Die praktische Bedeutung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird bestimmt durch die Vorteile, die sich aus den neuen Eigenschaften ergeben, die das pflanzliche Objekt durch die Aufnahme von genetischem Fremdmaterial in sein Genom erworben hat. Gegenwärtig sind DNS-Vektormoleküle bekannt, die für die Praxis wichtige Merkmale kodieren, wie z.B. die Beständigkeit gegenüber Herbiziden und bestimmten Erkrankungen. Die Zahl und das Spektrum der Merkmale, die durch diese Vektormoleküle kodiert werden, steigt ständig. Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet durch seine universelle Anwendbarkeit im Hinblick auf die Rezipienten und die transformierenden Faktoren und kann sowohl unter Verwendung bereits bekannter Plasmide und anderer DNS-Vektormoleküle als auch noch zu erzeugender bzw. zu isolierender Vektormoleküle verwendet werden, die für die Praxis wichtige Merkmale kodieren und zu einer Expression in Pflanzenzellen befähigt sind.

Unabhängig von der Art des transformierenden Faktors und des Rezipienten wird das erfindungsgemäße Verfahren zweckmäßigerweise wie folgt durchgeführt:

1. Vorbereitung des Rezipienten (Gewinnung von Zellen, Kalli und Zellverbänden, die zum Wachstum, zur Teilung und Morphogenese befähigt sind).
2. Vorbereitung der transformierenden Faktoren, die durch ein selektives Merkmal (Isolierung von DNS-Molekülen, Isolierung von Zellorganellen, Lösung von DNS-Molekülen in einer Pufferlösung usw.) gekennzeichnet sind.
3. Herstellung des Mikroinstruments.
4. Anbringen des Instruments auf dem Mikromanipulator und Fixierung des Rezipienten in der Mikrokammer.
5. Füllung der Mikronadel mit dem transformierenden Faktor.
6. Einführung der Mikronadelspitze in die Zelle.
7. Injektion von DNS-Molekülen bzw. eines anderen transformierenden Faktors in die Rezipientenzelle.
8. Wiederholung der Arbeitsgänge 6 und 7 bei den nachfolgenden Zellen.
9. Transferierung der Rezipienten auf das selektive Nährmedium.
10. Auswahl und Analyse der erhaltenen Transformanten.
11. Gegebenenfalls Regeneration der transformierten Pflanzen.

Der Nachweis der Aufnahme, der Expression und der Vererbung des injizierten genetischen Materials wird mit biochemischen und genetischen Methoden geführt (Potrykus J. et al., 1985, Crossway A. et al., 1986).

7
Beispiel 1

Man passiert einmal in zwei Wochen eine Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* in flüssigem Gamborg-Medium, das $1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, $0.5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Naphthylessigsäure, $0.5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Indolessigsäure und $0.2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kinetin enthält. 3 bis 5 cm³ der Zellsuspension werden in eine Kammer für die Mikroinjektion eingebracht. Nach dem Fixieren einer Einzelzelle mit einem Mikrosaugnapf wird in diese eine 10 Mikronadel mit einem Spitzendurchmesser von ca. 1 μm eingeführt. Mit Hilfe eines Druckluftsystems werden aus der Mikronadel 1 bis 2 pl (Pikoliter) Pufferlösung (10 mMol Tris, pH-Wert 7,2, 1 mMol Natriumethylendiamintetraacetat, 5 mMol KC1), die das Plasmid pLGV 15 23 Neo (Herrera-Estrella L. et al., 1983) in einer Konzentration von 100 Kopien pro Pikoliter Puffer enthält, eingespritzt.

Die Mikrokolonien, die sich aus den injizierten Zellen gebildet haben, werden dann auf ein agarisiertes Gamborg-Medium mit $120 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kanamyzinsulfat übertragen. Aus 20 injizierten Zellen erhält man drei Zelllinien, die über lange Zeit ihre Antibiotikumbeständigkeit bewahren. Durch Übertragung einer der Linien auf ein phytohormonfreies Gamborg-Medium wurden zum 20 Wachstum und zum Einwurzeln in kanamyzinhaltigem Medium befähigte Pflanzen regeneriert.

Beispiel 2

Eine Kalluskultur eines Gewebes von Mohn (*Papaver bracteatum*), die aus unreifen Kapseln der intakten Pflanze erhalten wurde (Kuzovkina, Rabinovic, 1981), wird auf agarisiertem Murashige-Skoog-Medium, das $1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kinetin, $1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure enthält, längere Zeit passiert. Danach wird das Gewebe alle 15 bis 17 Tage auf frisches Medium übertragen. Der Wachstumsindex beträgt 2,6 (pro 15 Tage). Wird ein phytohormonfreies Medium verwendet, lassen sich schon bei der ersten Passage nekrotische Gewebeveränderungen feststellen und die Biomasse nimmt praktisch nicht zu. Die Kallusmasse des Mohns ist auf dem erwähnten Medium in Abwesenheit von Phytohormonen nicht wachstumsfähig.

1 mg des im Wachstum befindlichen weichen Kallus wird in ein flüssiges Medium eingebracht und mit einem sterilen Glasstab zerrieben. Mit einer Pipette wird dann die Zellsuspension in eine Mikrokammer transferiert. Die Injizierung erfolgt nach dem in Beispiel 1 angeführten Verfahren mit dem Unterschied, daß das Einspritzen durch ein hydraulisches System bewerkstelligt wird und daß als transformierender Faktor das Plasmid pGV 0319 (Depicker A. et al., 1980) verwendet wird, das den Mittelteil der T-DNA des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* pTiC 58 enthält. 34 Zellen wurden nach der Injizierung auf ein phytohormonfreies Murashige-Skoog-Medium übertragen. Nach zweimonatiger Züchtung auf diesem Medium wurde ein Kallusgewebe erhalten, das zu einem starken und beständigen Wachstum auf dem Nährmedium in Abwesenheit von Phytohormonen befähigt war, wobei der Wachstumsindex nicht schlechter war, als bei der nicht transformierten Zelllinie in Anwesenheit von Phytohormonen.

Beispiel 3

Das Verfahren wird analog zu Beispiel 2 durchgeführt mit dem Unterschied, daß man als Rezipienten Zellen im

6 Mikrokallus (8 bis 30 Zellen) von *Lycopersicum esculentum* im Sachin-Medium unter Zugabe von 0,3 Gew.-% Agarose verwendet. Durch die Einführung des Plasmids in 95 Zellen wurden 19 zum Wachstum auf hormonfreiem Medium befähigte Zelllinien herausselektiert.

Beispiel 4

Das Verfahren wird analog zu Beispiel 1 durchgeführt mit dem Unterschied, daß man als transformierenden Faktor das Kosmid pG-A 472 (An G. et al., 1985) verwendet. Die Injizierung erfolgt dabei unter Einwirkung eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von 3 bis 5 V mit 10 Impulsen bei einer Impulsdauer von 0,5 s. Aus 23 auf diese Weise transformierten Zellen erhielt man 6 Zelllinien, die zum Wachstum auf einem Medium befähigt waren, das $120 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kanamyzinsulfat enthielt. Von zwei Zelllinien wurden Pflanzen regeneriert, die fähig sind, auf kanamyzinhaltigem Medium zu wachsen und zu wurzeln.

Beispiel 5

Aus unreifen Weizenkeimlingen wurde nach bekannten Verfahren (Gaponenko et al., 1985) auf einem Murashige-Skoog-Medium, das $2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und $0.1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kinetin enthielt, ein embryogener Kallus gewonnen. Nach dreiwöchiger Züchtung wurde der Kallus auf eine Petrischale übertragen, wonach man unter dem Mikroskop mit Präpariernadeln vom Kallus Stücke abtrennte, die aus kleinen kompakt gepackten Zellen bestanden. Diese Gebilde wurden dann in eine Mikrokammer mit einem Nährmedium übertragen und mechanisch zwischen zwei, miteinander 35 einen Winkel einschließenden Glassstückchen fixiert. Die Injizierung der DNS in die Zelle erfolgte wie in Beispiel 4 beschrieben. Auf diese Weise wurden 6 bis 10 im Blickfeld des Mikroskops befindlichen Zellen DNS injiziert. Danach wurde das Kallusstück mit einer Nadel gewendet und die nächsten Zellen behandelt. Nach der Injizierung von 30 Zellen wurde der proembryogene Kallus auf ein Murashige-Skoog-Medium übertragen, das $1,2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, $0,1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kinetin und $0,1 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Gibberellinsäure enthielt. Nach 40 zweiwöchiger Züchtung wurde der Kallus auf ein Medium, das $50 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kanamyzinsulfat enthielt, übertragen. Nach vierwöchiger Züchtung auf diesem antibiotikumhaltigen Medium, wurden die im Wachstum befindlichen Kallus auf ein Murashige-Skoog-Medium, das $0,2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und $50 \text{ mg}/\text{dm}^3$ Kanamyzinsulfat enthielt, übertragen und dem Licht ausgesetzt (ca. 2000 Lux 16 Stunden pro Tag). Die gebildeten Embryoiden wurden auf ein Murashige-Skoog-Medium, das keine Hormone, aber den gleichen Gehalt 55 an Kanamycin aufwies, ausgebracht. Die vollständig ausgebildeten Pflanzen wurden dann in den Boden gepflanzt.

Beispiel 6

Das Verfahren wird analog zu Beispiel 4 durchgeführt mit dem Unterschied, daß als Rezipient ein embryogener Kallus von Hafer (*Avena sativa*) verwendet wird und das Nährmedium keine Gibberellinsäure enthält.

Beispiel 7

Aus den Kotyledonarknoten von aseptisch gezege-

9

nen Sojapflanzen (*Glycine max*) wurde auf einem Murashige-Skoog-Medium, das einen reduzierten Salzgehalt aufwies, in Gegenwart von 5 mMol Benzylaminopurin (Wright M.S. et al., 1986) ein primärer Kallus gewonnen. Nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen 5 wurden Kallusstücke bis zu einer Größe von 2 mm, die den regenerierfähigen Teil und die de novo gebildete Sproßspitze enthielten, isoliert. Die genetische Transformation wurde analog zu Beispiel 5, jedoch mit dem Unterschied durchgeführt, daß die Rezipienten Zellen 10 des proregenerativen Gewebes und der Sproßspitze waren. Die behandelten Kalli wurden auf das Ausgangsmedium übertragen, dem 80 mg/dm³ Kanamycininsulfat zugesetzt wurde. Nach einer Kultivierungsdauer von drei Wochen wurden die gebildeten grünen Triebe in 15 einem Murashige-Skoog-Medium, das keine Phytohormone, aber 80 mg/dm³ Kanamycin enthielt, eingewurzelt. Die vollständig ausgebildeten Pflanzen wurden in den Boden gepflanzt.

20

Beispiel 8

Das Verfahren wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt. Als Rezipienten werden einzelne weiße Zellen des Plastommutanten von *Nicotiana tabacum* der 25 Linie IP und als autonom replizierende Organellen Chloroplasten verwendet, die aus den Blättern von *Nicotiana tabacum* der Linie SR 2 isoliert wurden, die sich durch Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin, die durch die Chloroplasten kodiert wird, aus- 30 zeichnet. Eine Mikropipette mit einem Spitzendurchmesser von 8 µm wird mit einer Chloroplastensuspension in einem Ensen-Baschem-Medium gefüllt. Aus dieser Mikropipette werden dann 5 bis 10 Chloroplasten in die Zelle gespritzt. Nach den ersten Teilungen der Zellen 35 nach der Injektion werden diese auf ein Gamborg-Medium übertragen, das 1 mg/cm³ Streptomycininsulfat enthält. Von 16 auf diese Weise injizierten Zellen werden 3 Zelllinien isoliert, die grün gefärbt sind und auf einem Medium, das 1 mg/cm³ dieses Antibiotikums ent- 40 hält, wachstumsfähig sind.

45

50

55

60

65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)